

**Vergleichende Studien über die
Hapten-Carrier-Spezifität der Blastzellentransformation
in Lymphozytenkulturen und der antikörperbildenden
Zellen im Plaquetest**

von

Peter Gollnick

aus

Pirna/Elbe

Aus der Abteilung für klinische Immunologie
des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg
Vorstand: Professor Dr. med. F. Scheiffarth

**Vergleichende Studien über die
Hapten-Carrier-Spezifität der Blastzellentransformation
in Lymphozytenkulturen und der antikörperbildenden
Zellen im Plaquetest**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Peter Gollnick
aus
Pirna/Elbe

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der
Universität Erlangen - Nürnberg.



Dekan: Prof. Dr. G. Koch

Referent: Prof. Dr. F. Scheiffarth

Tag der mündlichen Prüfung: 7. 3. 1972

Die Hapten-Carrier-Spezifität von Immunreaktionen wurde eingehend von MITCHISON (7,23), RAJEWSKY (30,31), BENACERRAF (1-4, 13,17,25,27,28,29,40) und SCHLOSSMANN (33-38,41) untersucht. Tiere, die mit einem Hapten-Carrier-Komplex sensibilisiert wurden, bilden Antikörper mit einer Spezifität, für das Hapten, den Carrier und Determinanten, die aus der Wechselwirkung des Hapten mit dem Carrier herrühren. Zur Einleitung von haptenspezifischen Immunantworten ist der Carrier unabdingbar notwendig. In jüngerer Zeit hat BENACERRAF nachgewiesen, daß sogar zur Förderung der haptenspezifischen Antikörper der Carrier wichtiger zu sein scheint als das Hapten selbst. Wenn zur Sensibilisierung der Hapten-Carrier-Komplex und zur Steigerung der homologe Carrier verwendet wurden, beobachtete er eine sekundäre Immunantwort gegenüber dem Hapten, das dem vergleichbar war, welches nachgewiesen wurde nach neuerlicher Injektion des vollständigen Hapten-Carrier-Komplexes. Die Untersuchungen von GELL (14,39), OVARY (25), BENACERRAF (2,3,4,13,28), SALVIN (32) und SCHLOSSMANN (38) lassen vermuten, daß die verzögerte Hypersensibilitätsreaktion im Prinzip carrierspezifisch ist. Die Hautreaktion des verzögerten Typs (1,2,14,32,39) sowie der Migrationshemmtest erfordern eine signifikante Mitwirkung des Carriermoleküls. Die bedeutende Rolle des Carriers wird ebenso beschrieben für die stimulierenden Eigenschaften auf die ^3H -Thymidin-Einlagerung in Zell-DNA, wenn Lymphozytenkulturen mit dem Hapten bzw. dem Carrier versehen wurden. DUTTON (11) sowie PAUL und seine Mitarbeiter (29) wiesen nach, daß Haptenverbindungen mit heterologen Proteinen Lymphozyten nur in viel höherer Konzentration stimulieren können als sie für Experimente unter Verwendung des immunisierenden Hapten-Carrier-Komplexes benötigt werden.

In neuerer Zeit berichteten BENEZRA und seine Mitarbeiter (6,15), daß das Phänomen der Blastzellentransformation in guter Wechselwirkung steht zu den zellulären und humoralen Immunantworten und nicht nur zur verzögerten Hypersensibilitätsreaktion. Mit unseren Untersuchungen wurde beabsichtigt,

die hapten- und carrierspezifische Stimulation der DNA-Synthese in Lymphknotenzellkulturen von Tieren zu bestimmen, die auf den Hapten-Carrier-Komplex sensibilisiert wurden. Ferner sollte die Kinetik der hapten- und carrier-spezifischen Lymphozytentransformation in verschiedenen Intervallen nach einer zweiten Sensibilisierungsinjektion mit Hapten-Carrier-Komplex untersucht und in Wechselbeziehung gesetzt werden zu der Kinetik der im Plaquetest bestimmten, Antikörper bildenden Zellen.

Material und Methoden:

F1-hybride Mäuse mit den angeborenen Eigenschaften C57Bl X AKR wurden bei diesen Untersuchungen verwendet.

2,4-dinitrophenyl-humanserumalbumin (DNP-HSA) wurde nach der Methode von EISEN (12,22) hergestellt. DNP-Cl wurde dem HSA in einem Mengenverhältnis von 37 : 1 hinzugefügt. Das unverbundene DNP wurde vom DNP-HSA auf einer Sephadex-G25-Säule getrennt. Das Verbindungsverhältnis wurde durch Absorbanz bei 360 mμ mit 10 - 15 M DNP pro M HSA bestimmt. DNP-Rinderserum- γ -globulin (BGG) wurde auf die gleiche Weise hergestellt (Verbindungsverhältnis 7 - 12 DNP pro M BGG). DNP-poly-l-lysin (DNP-PLL) wurde aus kommerziellem PLL (Serva-Co., Heidelberg M6 100 000) und DNP-Cl zubereitet; das Verbindungsverhältnis war 30-35 M DNP pro M PLL. Als Träger wurde HSA verwendet.

Sensibilisierungsprozeß:

F1-Hybriden wurde 200 μ g DNP-HSA injiziert, das mit 0,2 ml kompletten Freund's Adjuvans (Difco Lab.) gemischt war. Die Injektion erfolgte in die 4 Pfötchen. 10 Tage später wurde eine zweite Injektion von 50 μ g DNP-HSA intraperitoneal verabreicht. Kontrollgaben wurden in gleichen Abständen mit vollständigem Freund's Adjuvans allein verabreicht. Die Mäuse wurden 1,3,5,7,10 und 15 Tage nach der zweiten Sensibilisierung durch Zervikaldislokation getötet. Milz und Lymphknoten wurden entfernt und die Zellen vorbereitet für die Lymphozytentransformation und den Plaquetest.

Lymphozytentransformation (21, 24, 26):

Die Axillar-, Inguinal-, Zervikal- und Paraaortallymphknoten und die Milz wurden entfernt. Es wurde eine Zellsuspension aus den Organen hergestellt, indem man sie durch ein rost-freies Stahlsieb quetschte. Nach einer Waschung der Zellen in MEM wurden die anhängenden Zellen entfernt, indem man die Suspension durch Nylonwolle passieren ließ. Der Prozentsatz der lebenden Zellen wurde durch den Trypan-Blau-Exklusions-Test mit mehr als 95% bestimmt.

4×10^6 Zellen wurden in Röhrchen mit einem Inhalt von 3 ml modifiziertem Eagle's MEM und 10% Rinderfetalserum, das hitzeinaktiviert war, kultiviert. (Das Rinderserum enthielt einen Zusatz von 1 ml 0,2 M Glutamin, 1 ml 0,2 M Arginin, 10 000 u Penicillin und 10 mg Streptomycin auf 100 ml Medium.) Die Röhrchen wurden bei 37°C 72 Stunden in feuchter Atmosphäre mit 5% CO₂ eingelagert. Alle Kulturen wurden zweifach oder dreifach angelegt. DNP-HSA, DNP-BGG oder HSA wurde in einem Dosierungsbereich von 100 - 0,1 µg zugefügt. DNP-PLL wurde in einem Dosierungsbereich von 100 - 0,1 µg angewandt. Kontrollkulturen wurden mit 5 µl PHA (Borroughs-Welcome) oder ohne eine zugefügte Substanz eingelagert.

Nach Inkubation von 48 Stunden wurde den Röhrchen 5 u Ci-³H-Thymidin hinzugegeben (Radiomechanisches Zentrum Amersham, England, spezifische Aktivität 5 Ci/mM). Die Röhrchen wurden weitere 24 Stunden bei 37°C eingelagert.

Zur Bestimmung der ³H-Thymidin-Einlagerung in der zellulären DNA wurde 1 ml eiskalte Kochsalzlösung zugegeben. Die Zellen wurden dreimal in Kochsalzlösung gewaschen. Das Sediment wurde in 5%-ige, eiskalte Trichloressigsäure gestürzt. Nach drei Waschungen in Trichloressigsäure und einer Waschung in Methanol wurde das Sediment in 5 ml Digestin (Merck, Darmstadt) gelöst. 0,1 ml wurde auf 10 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben, die aus 4 Teilen Toluol und einem Teil Methanol mit 4 g PPO und 1 g Dimethyl-POPOP besteht. Der cpm-Wert wurde in einem Tricarb-Flüssigkeits-Szintillations-Zähler (Packard M2) bestimmt. Der dmp-Wert wurde aus dem cpm-Wert nach einer Quench-Korrektur-Kurve errechnet.

Plaquettechnik :

Antikörper bildende Zellen wurden nach einer Modifikation der JERNE Technik (10,16,42) bestimmt. Die Suspension von Lymphknoten und Milzzellen wurde bereitet wie beschrieben für die Lymphocyten-Transformationsversuche. Die Suspension in Hanks Lösung wurde auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen pro 0,1 ml gebracht. Hammelerythrocyten wurden dreimal in phosphatgepufferter Salzlösung pH 7,2 gewaschen. Proteinantigene wurden an die Hammelerythrocyten gebunden unter Verwendung von bisdiazotiertem Benzidin als Verbindungsreagens nach der Methode von Stavitsky und Arquilla, die von WIGZELL (42,43) abgeändert wurde. Einer Mischung von 1 ml gewaschenem Hammelerythrocytensediment, in Suspension von 40 ml 0,15 M Phosphatpuffer pH 7,2 und 1 mg DNP-HSA oder HSA wurden unter Rühren 8 ml einer auf 1 : 30 verdünnten Benzidinreagens (wie oben) zugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation wurde die Hammelerythrocytensuspension zweimal mit Phosphatpuffer und einmal mit Kochsalzlösung 0,01 M Tris pH 7,4 gewaschen. Die Hammelerythrocyten-Konzentration wurde auf 4×10^8 Zellen pro 0,1 ml gebracht.

Die Hammelerythrocyten, an die DNP direkt gebunden wurde, wurden auf folgende Art aufbereitet. 10 mg DNP-CL wurden in 5 ml Azeton aufgelöst. 0,3 ml dieser Lösung wurden mit 5 ml einer 10 %-igen Hammelerythrocyten-Suspension und 10 ml EDTA-Puffer pH 8,4 versetzt. Nach 15 Minuten Einlagerung bei 37° C wurde der Suspension 90 ml EDTA-Puffer pH 7,2 zugeführt. Die Hammelerythrocyten wurden bei 900 U/Min. 10 Min. lang zentrifugiert und zweimal mit EDTA-Puffer gewaschen. Schließlich wurde die Hammelerythrocyten-Suspension auf 4×10^8 in 0,1 ml gebracht. In Kontrollexperimenten wurden unbehandelte Hammelerythrocyten verwendet.

0,1 ml Lymphknoten-Milzzellen-Suspension und 0,1 ml Hammelerythrocyten-Suspension wurden vermischt mit 2 ml 0,6%-iger Agarose in Geys Lösung. Die Mischung wurde auf eine Bodenschicht von 8%-iger Agarose gegossen und 1 Stunde lang bei 37° C inkubiert, danach wurden 2 ml 5%-igen Meerschweinchen-serums in Salzlösung zugefügt und die Platten weitere 60 Min.

bei 37° C inkubiert. Zum indirekten Plaquetest wurden die Platten 1 Stunde lang 2 ml eines auf 1 : 100 verdünnten Ziegen-Antimaus-Globulins ausgesetzt bevor das Meerschweinchenkomplement hinzugefügt wurde. Die Plaques wurden unter dem Vergrößerungsglas rot. Der Plaquetest wurde für jedes Tier und auf jedes Antigen wenigstens zweimal ausgeführt.

ERGEBNISSE :

Stimulatorische Eigenschaften von Hapten und Carrier auf Lymphocyten sensibilisierter Mäuse :

Lymphknotenzellen, die mit DNP-HSA inkubiert waren, zeigten eine deutliche dosisabhängige Antwort mit ^3H -Thymidin-Einlagerung. Die Ergebnisse einer repräsentativen Untersuchung sind aus ABB. 1 ersichtlich. DNP-HSA stimulierte die DNA-Synthese der Lymphknotenzellen von Mäusen, die über einen weiten Bereich von Antigenkonzentrationen auf DNP-HSA sensibilisiert waren. Der Träger HSA war gleichfalls ein mächtiges Stimulans und zeigte eine Dosisantwortkurve, die der DNP-HSA-Kurve parallel lief. Jedoch wurde eine zwar begrenzte, aber ersichtliche Stimulation zur ^3H -Thymidin-Aufnahme auch durch DNP-PLL induziert. Ungebundenes PLL in gleichen Konzentrationen vermochte die sensibilisierten Lymphknotenzellen nicht zu stimulieren. Die Daten in Abb. 1 wurden bestimmt in Lymphknotenzellkulturen sensibilisierter Mäuse, die drei Tage nach der zweiten intraperitonealen Antigeninjektion verendeten. Lymphknotenzellen von Mäusen, die mit vollständigem Freund's Adjuvans ohne den Hapten-Carrier-Komplex vorbehandelt waren, wurden weder durch DNP-HSA noch durch DNP-PLL stimuliert.

Die Stimulation sensibilisierter Lymphknoten- und Milzzellen ist weiterhin abhängig vom Zeitablauf zwischen der zweiten Antigeninjektion und der Entfernung der Lymphknoten und Milzorgane für Zellkulturen. Die Kinetik der Lymphocyten-transformation bei verschiedenen zeitlichen Intervallen nach

der zweiten Antigenapplikation wird in Abb. 2, 3, 4 und in Tafel 1 veranschaulicht.

Die Inkubation mit DNP-HSA führte zu einem drei- bis fünf-fachen Anstieg der ^3H -Thymidin-Einlagerung in zelluläre DNA in Kulturen, die 1 bis 3 Tage nach der zweiten Antigeninjektion durchgeführt wurden. Zwischen dem 5. und 7. Tage wurde die DNA-Synthese in Kulturen von sensibilisierten Zellen die mit DNA-HSA stimuliert waren, bedeutend reduziert (p 0,01). Jedoch zeigten Kulturen, die 10 bis 15 Tage nach der zweiten Antigeninjektion angelegt und mit niedrigen Dosen von DNP-HSA inkubiert wurden, eine vermehrte ^3H -Thymidin-Einlagerung. Die gleichen Ergebnisse wurden in Kulturen beobachtet, die mit dem Carrier HSA inkubiert waren; aber hier waren 5- bis 10-mal höhere Konzentrationen nötig, um eine Stimulation zu erreichen, die der vergleichbar war in Kulturen mit DNP-HSA. In Lymphknotenzellkulturen, die man mit DNP-PLL inkubiert hatte, wurde eine mächtige Stimulation der DNA-Synthese nur in den ersten drei Tagen nach der zweiten Antigeninjektion beobachtet. An den folgenden Tagen war die ^3H -Thymidin-Aufnahme herabgedrückt und es zeigte sich nur ein geringer Anstieg nach 5 bis 10 Tagen.

Kinetik der Antikörper bildenden Zellen :

In parallelen Experimenten wurden Gesamtzahlen der Antikörper bildenden Zellen spezifisch für DNP-HSA, HSA und DNP-PLL in verschiedenen Abständen nach der zweiten Antigeninjektion bestimmt. Mittelwerte und Normalabweichungen werden in Abb. 2, 3 und 4 und in Tafel 2 veranschaulicht.

Direkt plaquebildende Zellen, die DNP-HSA-gekoppelte Hammelerythrocyten als Zielzellen brauchten, wurden bereits einen Tag nach der zweiten Immuninjektion nachgewiesen. Die maximalen Gesamtzahlen wurden in 3 - 5 Tagen erreicht. Danach nahmen die Gesamtzahlen der Antikörper bildenden Zellen schnell ab. Der Höhepunkt der plaquebildenden Zellen in den Versuchen, bei denen HSA oder DNP in der Verbindung mit Hammelerythrocyten als Zielzellen benutzt wurden, zeigte eine leichte Verzögerung.

Wenig oder gar keine plaquebildenden Zellen wurden am ersten Tage beobachtet. Entsprechende Ergebnisse wurden erzielt für plaquebildende Zellen, die im indirekten Plaquetest bestimmt wurden : keine plaquebildenden Zellen am ersten Tag, höchste Gesamtzahlen nach 5 bis 7 Tagen und Abnahme der plaquebildenden Zellen bis zum 15. Tag. Die im Hintergrund dabei erscheinende Gesamtzahl plaquebildender Zellen wurde in Experimenten mit unverbundenen Hammelerythrocyten bestimmt mit $1,2 \pm 0,65$ plaquebildenden Zellen pro 10^6 Milzzellen.

DISKUSSION

Die Hapten-Carrier-Spezifität immunkompetenter Zellen war in den letzten paar Jahren eingehend untersucht worden. Es kann aus den nun greifbaren, veröffentlichten Daten der Schluß gezogen werden, daß das Carriermolekül erforderlich ist zur Einleitung haptenspezifischer Immunantworten und zur Stimulation sensibilisierter Zellen. Von SCHLOSSMAN (38), BENACERRAF (29) und DUTTON (11) konnte nachgewiesen werden, daß die Lymphocytenumwandlung im Prinzip carrierspezifisch ist. Jedoch wurden in einigen Experimenten begrenzte Antworten auf Haptenverbindungen von heterologen Proteinen oder Kopolymeren von Aminosäuren beobachtet.

Unter den Bedingungen unserer Experimente zeigt nicht nur der Hapten-Carrier-Komplex, sondern auch das Hapten DNP gekoppelt an PLL, stimulatorische Eigenschaften auf sensibilisierte Lymphocyten. Diese Lymphocytentransformation ist ein spezifisches Phänomen; denn Lymphknotenzellen von Tieren, die mit komplettem Freund's Adjuvans behandelt wurden, zeigten keine vermehrte ^3H -Thymidin-Einlagerung nach Inkubation mit DNP-PLL. Auch der Zusatz von PLL zur Kultursubstanz führte zu keiner Stimulation der DNA-Synthese in Kulturen von sensibilisierten Lymphknotenzellen.

Nach unseren kinetischen Untersuchungen ist es wahrscheinlich, daß die stimulatorischen Eigenschaften vom Hapten-Carrier-Komplex und den Hapten für sensibilisierte Lymphknotenzellen charakteristische Veränderungen zeigt, wenn die Anzahl spezifisch stimulierbarer Zellen zu verschiedenen Zeitabständen

nach der zweiten Antigenapplikation bestimmt wird. Auf eine Phase guter Stimulation durch das sensibilisierende Antigen unmittelbar nach der Antigenboosterinjektion folgt eine Phase, in der die sensibilisierte Zellpopulation aus den Lymphknoten und Milzorganen verschwindet oder zumindest bedeutend reduziert wird. Schließlich kommen sensibilisierte Zellen in der Lymphknotenzellpopulation wieder vor, aber jetzt scheint der Bereich der Antigenkonzentration, der spezifische Stimulation induziert, geringer zu sein. Während die carrierspezifische Stimulation sich ähnlich verhält, lassen die durch DNP-PLL stimulierten Zellen diese charakteristische Zwei-Stufen-Kurve nicht erkennen. Nach einer Phase wirksamer Stimulierung in den ersten drei Tagen verschwinden die sensibilisierten Zellen aus der Lymphknotenzellpopulation und kehren nicht vor dem 15. Tag zurück. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß der homologe Carrier in der späteren Phase spezifischer eingreift als im frühen Stadium einer sekundären Immunantwort. Es besteht Übereinstimmung, daß die sensibilisierten Zellen spezifische Rezeptoren auf ihrer Oberfläche haben, die in der Lage sind, das Antigen zu binden (4,23). Diese zellgebundenen Antikörper müssen spezifisch nicht nur für das Hapten, sondern auch für das Carriermolekül sein (43). Die verschiedene Affinität von humoral- und zellgebundenen Antikörpern bezüglich des Haptens und Carriers begünstigen nicht die Auslegung, daß diese beiden Antikörpertypen identisch sind. Aus unseren Ergebnissen darf geschlossen werden, daß die Affinität der Zellrezeptoren bezüglich des Haptens oder des Carriers während der sekundären Immunantwort verändert wird. Besonders die durch das Hapten stimulierte Zellsiedlung scheint nur in der allerersten Phase der sekundären Immunantwort vorhanden zu sein.

Auf Grund unserer Ergebnisse können nur Vermutungen angestellt werden über die Rolle der Lymphknoten Zellen, die während der ersten drei Tage nach der zweiten Antigeninjektion durch DNP-PLL stimuliert wurden. Die Frage, ob diese Zellen mit den durch die Plaque Technik bestimmten, Antikörper bildenden Zellen identisch sind oder mit Zellen, die eine verzögerte Hypersensibilitätsreaktion vermitteln

bzw. die in Gedächtniszellen umgewandelt werden, kann nicht beantwortet werden.

In unseren Untersuchungen offenbaren die Antikörper bildenden Zellen eine Kinetik, die reziprok zu der sich umwandelnden Lymphocyten ist. Die maximalen Gesamtzahlen der plaquebildenden Zellen mit Spezifität für das Hapten, den Carrier und den Hapten-Carrier-Komplex wurden drei bis sieben Tage nach der Aufschaukelungsinjektion beobachtet, d.h. während der Phase vermindelter Blastzellentransformation. Die Kurven der für die verschiedenen Antigene spezifischen plaquebildenden Zellen sind prinzipiell identisch und zeigen nur eine geringe Verschiebung des Maximums.

Die Frage, ob plaquebildende Zellen sich aus stimulierten Zellen entwickeln können, die im Anfangsstadium nach der Boosterinjektion beobachtet wurden, kann mit Hilfe unserer Untersuchungen nicht beantwortet werden. Experimente von LAMVIK (18,19,20), DOUGLAS und FUDENBERG (9) zeigen jedoch, daß Antikörper bildende Zellen vermehrt vorkommen in Kulturen von sensibilisierten Lymphknotenzellen, die durch das entsprechende Antigen stimuliert wurden. Auch BENEZRA und seine Mitarbeiter (6,15) schließen aus ihren Ergebnissen, daß die Blastzellentransformation in Wechselbeziehung steht sowohl zur zellulären als auch zur humoralen Immunantwort.

Abb. 1 :

Dosisantwortkurven der ^3H -Thymidin-Einlagerung in zellulärem DNA gemessen in Kulturen sensibilisierter Lymphknoten- und Milzzellen als Funktion der Konzentration des DNP-HSA (——), des HSA (- - - -), des DNP-BGG (.....) und des DNP-PLL (-.-.-.-.). Jede Kurve repräsentiert die kombinierten Daten zweifacher Kulturen mit wenigstens 8 Mäusen am dritten Tage nach der Boosterinjektion. Mittelwerte der ^3H -Thymidin-Einlagerung in Kulturen mit gleichen Tieren, die mit PHA oder mit keiner Substanz eingelagert waren, sind angegeben.

Abb. 2 :

Die Kinetik der ^3H -Thymidin-Einlagerung in Kulturen, die durch DNP-HSA stimuliert waren, und von Antikörper bildenden Zellen, die spezifisch sind für DNP-HSA verbundene Zielzellen. Stimulationsindizes ($\frac{\text{dpm DNP-HSA stim}}{\text{dpm unstim}}$) und Normalabweichungen werden bestimmt in Kulturen, die in verschiedenen Zeitabständen nach der Boosterinjektion mit DNP-HSA angelegt worden waren.

———— Kulturen inkubiert mit 10 ug DNP-HSA

———— Kulturen inkubiert mit 1 ug DNP-HSA

Entwicklung (Mittelwerte und Normalabweichungen) von direkt (-----) und indirekt (-----) plaquebildenden Zellen auf Hammelerythrocyten, die mit DNP-HSA verbunden sind.

Abb. 3 :

Die Kinetik der ^3H -Thymidin-Einlagerung in Kulturen, die durch HSA stimuliert waren, und von Antikörper bildenden Zellen, die spezifisch sind für HSA verbundene Zielzellen. Stimulationsindizes ($\frac{\text{dpm HSA stim}}{\text{dpm unstim}}$) und Normalabweichungen werden bestimmt in Kulturen, die in verschiedenen Zeitabständen nach der Boosterinjektion mit HSA angelegt worden waren.

————— Kulturen inkubiert mit 10 ug HSA

————— Kulturen inkubiert mit 1 ug HSA

Entwicklung (Mittelwerte und Normalabweichungen) von direkt (-----) und indirekt (-----) plaquebildenden Zellen auf Hammelerythrocyten, die mit HSA verbunden sind.

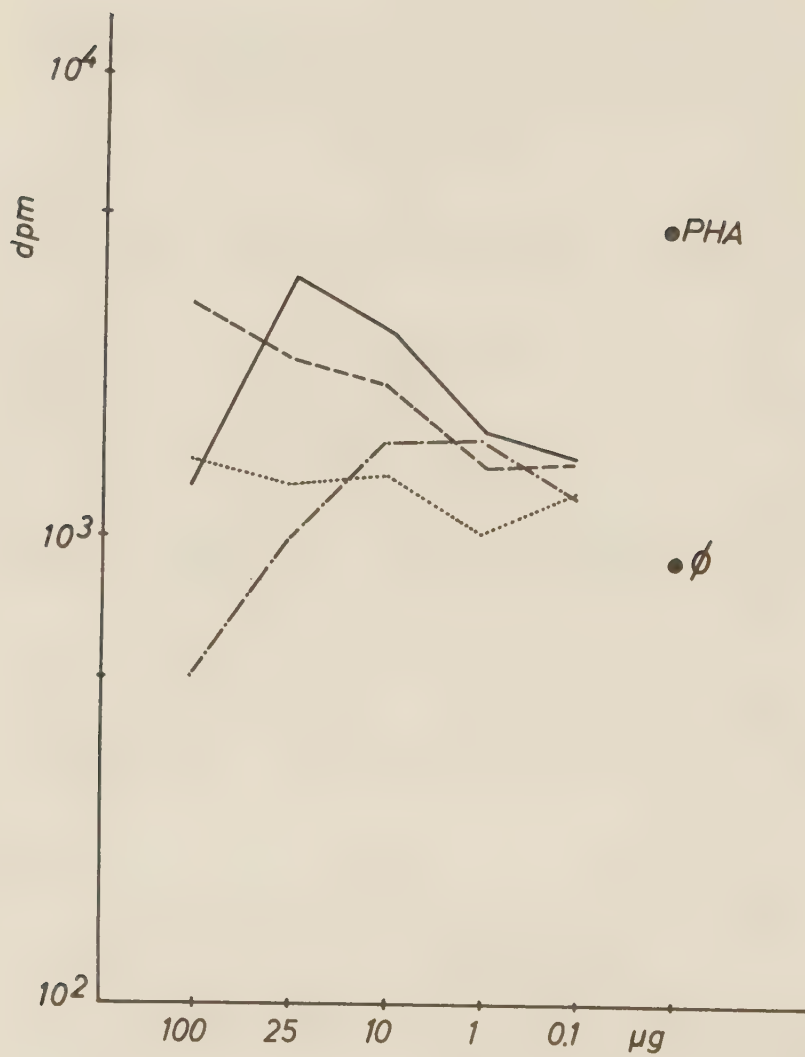
Abb. 4 :

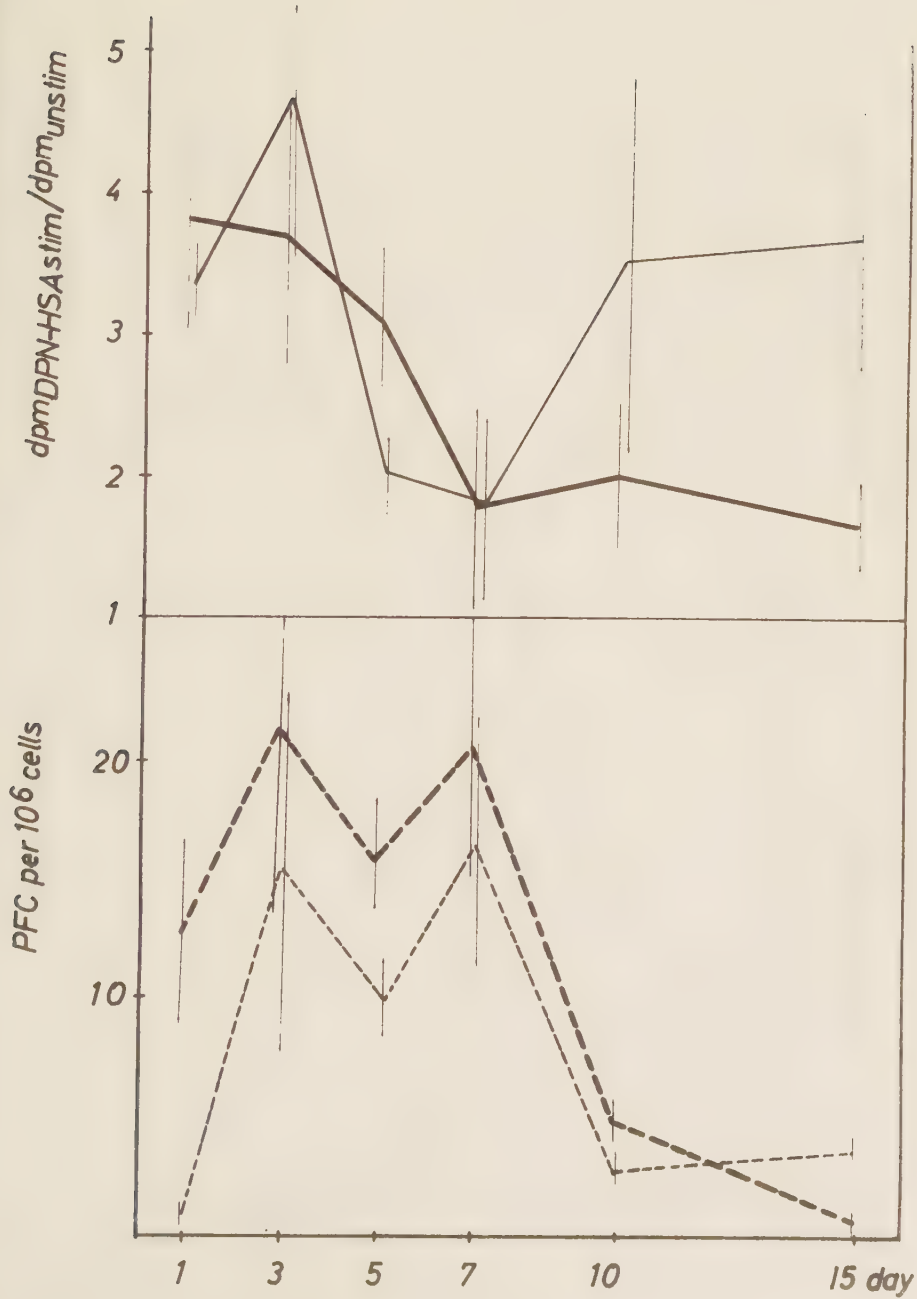
Die Kinetik der ^3H -Thymidin-Einlagerung in Kulturen, die durch DNP-PLL stimuliert waren, und von Antikörper bildenden Zellen, die spezifisch sind für DNP-PLL verbundene Zielzellen. Stimulationsindizes ($\frac{\text{dpm DNP-PLL stim}}{\text{dpm unstim}}$) und Normalabweichungen werden bestimmt in Kulturen, die in verschiedenen Zeitabständen nach der Boosterinjektion mit DNP-PLL angelegt worden waren.

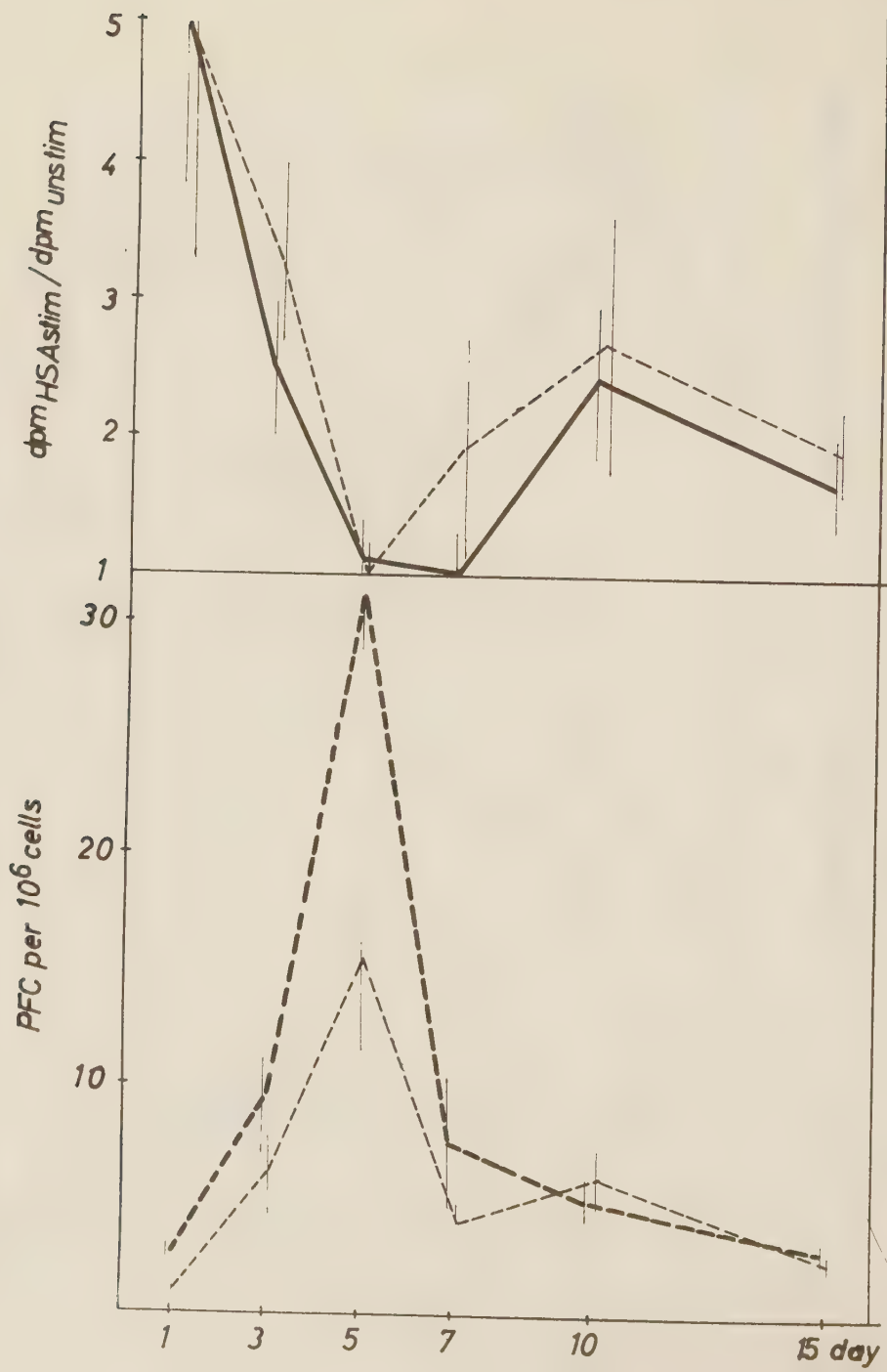
————— Kulturen inkubiert mit 10 ug DNP-PLL

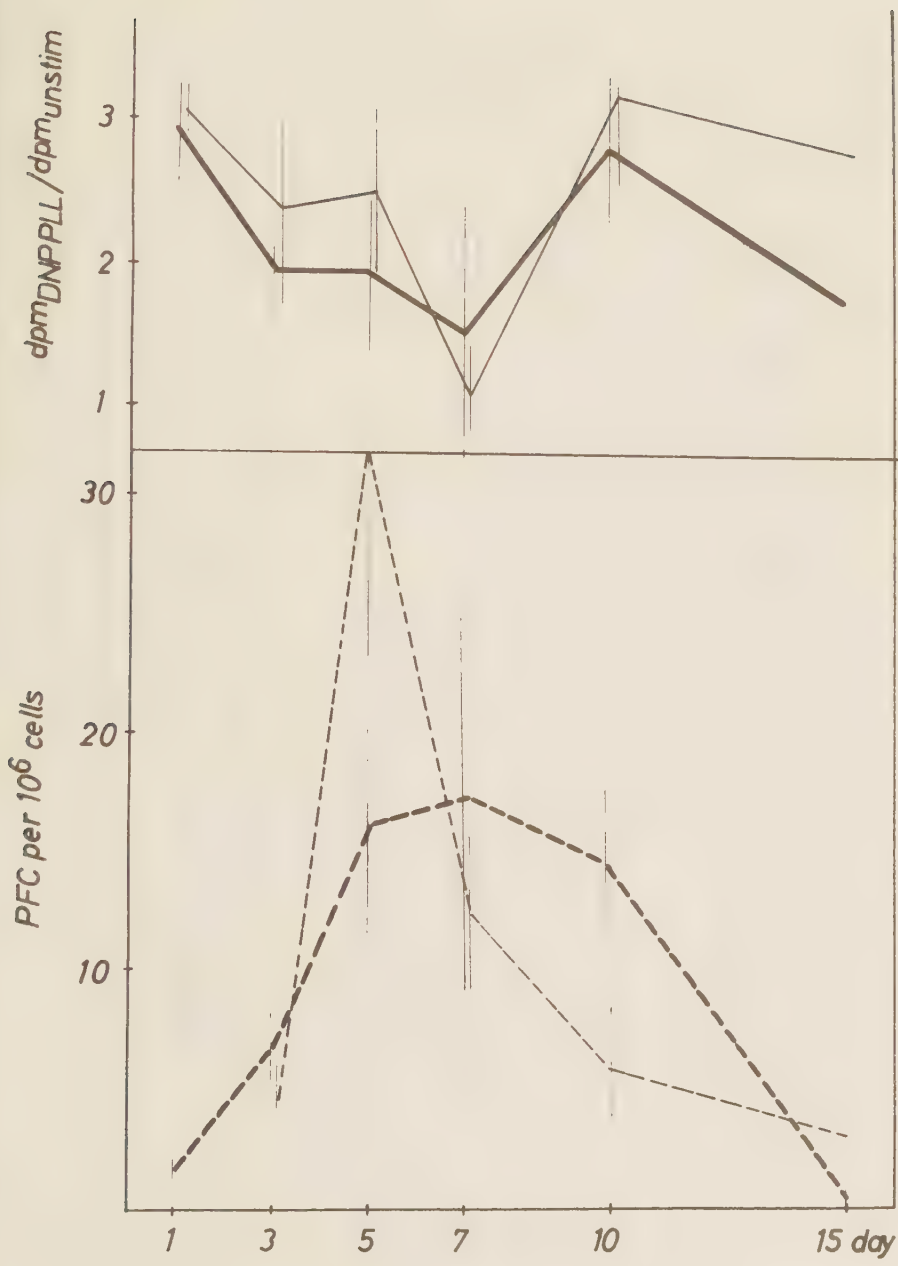
————— Kulturen inkubiert mit 1 ug DNP-PLL

Entwicklung (Mittelwerte und Normalabweichungen) von direkt (-----) und indirekt (-----) plaquebildenden Zellen auf Hammelerythrocyten, die mit DNP-PLL verbunden sind.









Stimulationsindex der kultivierten Lymphknotenzellen inkubiert mit

Tag	DNP-HSA		HSA		DNP-PLL	
	10 ug	1 ug	50 ug	5 ug	10ug	1 ug
1.	3.8 ± 0.83	3.3 ± 0.34	2.9 ± 0.37	3.1 ± 0.18	5.0 ± 1.18	4.9 ± 1.58
3.	3.7 ± 0.90	4.6 ± 1.08	1.9 ± 0.34	2.4 ± 0.72	2.5 ± 0.50	3.3 ± 0.69
5.	3.1 ± 0.47	2.0 ± 0.23	1.9 ± 0.23	2.5 ± 0.60	1.1 ± 0.28	0.9 ± 0.26
7.	1.8 ± 0.75	1.8 ± 0.65	1.5 ± 0.90	1.1 ± 0.32	1.0 ± 0.32	1.9 ± 0.81
10.	2.0 ± 0.56	3.5 ± 1.32	2.8 ± 0.70	3.2 ± 0.67	2.4 ± 0.56	2.6 ± 0.88
15.	1.7 ± 0.32	3.7 ± 0.88	1.7 ± 0.37	2.8 ± 0.34	1.7 ± 0.29	1.9 ± 0.34

Tafel 1: Stimulationsindizes von kultivierten Lymphknotenzellen von auf DNP-HSA, sensibilisierten Mäusen. Die Zellkulturen wurden mit DNP-HSA, HSA und DNP-PLL inkubiert. Mittelwerte und Normalabweichungen sind angegeben vom 1. bis 15. Tag nach einer Boosterinjektion mit DNP-HSA.

Gesamtzahlen von plaquebildenden Zellen

Tag	HE-DNP-HSA		HE-HSA		HE-DNP	
	direkt	indirekt	direkt	indirekt	direkt	indirekt
1.	12.9 ± 4.05	0.9 ± 0.53	1.7 ± 0.67	-	2.4 ± 0.26	1.0 ± 0.32
3.	21.2 ± 7.62	15.3 ± 7.61	6.8 ± 1.65	4.5 ± 1.74	9.5 ± 2.60	4.9 ± 1.99
5.	16.0 ± 2.27	9.9 ± 1.69	16.2 ± 4.24	32.0 ± 8.86	35.2 ± 2.59	15.1 ± 3.87
7.	20.7 ± 5.61	16.5 ± 5.40	17.4 ± 8.29	12.4 ± 3.36	7.6 ± 2.94	3.8 ± 0.90
10.	4.4 ± 1.01	3.0 ± 0.83	14.3 ± 7.03	6.0 ± 2.52	4.8 ± 1.02	5.9 ± 1.38
15.	0.6 ± 0.31	3.6 ± 0.44	0.3 ± 0.11	3.0 ± 0.86	2.7 ± 0.50	2.3 ± 0.47

Tafel 2: Gesamtzahlen von antikörperbildenden Zellen bestimmt im direkten und indirekten

Plaquetest unter Verwendung von Hammelerytozyten (HE), die mit DNP-HSA, mit HSA und mit DNP verbunden waren. Die Hintergrund-Gesamtzahl unter Verwendung von unverbundenen Hammelerytozyten wurde bestimmt mit $1,2 \pm 0,65$. Die Mittelwerte und Normalabweichungen sind angegeben vom 1. bis 15. Tag nach der Boosterinjektion mit DNP-HSA.

9. DOUGLAS, S.D. & FUDENBERG, H.H. (1969) In vitro development of plasma cells from lymphocytes following pokeweed mitogen stimulation : a fine structural study. *Exp.Cell Res.* 54, 277.
10. DRESSER, D.W. & WORTIS, H.H. (1967) Localized hemolysis in gel in Handbook of Experimental Immunology. D.M.Weir editpr. Blackwell Scientific Publications, Oxford. P.1054.
11. DUTTON, R.W. & BULMAN, H.N. (1964) The significance of the protein carrier in the stimulation of DNA synthesis by hapten-protein conjugates in the secondary response. *Immunol.* 7, 54.
12. EISEN, H.N. & SISKIND, G.W. (1964) Variations in affinities of antibodies during the immune response. *Biochemistry* 3, 996.
13. FOERSTER, J., LAMELIN, J.-P., GREEN, I. & BENACERRAF, B. (1969) A quantitative study of the stimulation of DNA synthesis in lymphnode cell cultures by antilymphocyte serum, anti-gamma globulin serum, specific antigen and phytohemagglutinin. *J.Exp.Med.* 129, 295.
14. GELL, P.G.H. & BENACERRAF, B. (1961) Studies on hypersensitivity. IV. The relationship between contact and delayed sensitivity: a study on the specificity of cellular immune reaktions. *J.Exp.Med.* 113, 571.
15. GERY, I., BENEZRA, D. & DAVIES, A.M. (1969) The relationship between lymphocyte transformation and immune response. I. Ratio of transforming cells to antibody forming cells. *Immunology* 16, 381.
16. JERNE, N.K., NORDIN, A. & HENRY, C. (1963) The agar plaque technique for recognizing antibody producing cells. Cell-Bound Antibodies (Ed. by B.Amos and H.Koprowski), p. 109. The Wistar Institute Press, Philadelphia.

17. KANTOR, S.F., OJEDA, A. & BENACERRAF, B. (1963) Studies on artificial antigens. I. Antigenicity of DNP-polylysine and DNP-copolymers of lysine and glutamic acid in guinea pigs. *J.Exp.Med.* 117, 55.
18. LAMVIK, J.O. (1969) The development of plasma cells in antigen stimulated rabbit blood lymphocyte cultures. *Scand.J.Haemat.* 6, 155.
19. LAMVIK, J.O. (1969) Antibody synthesis in cultures of blood lymphocytes from typhoid immunized rabbits following stimulation in vitro with killed typhoid bacteria. *Acta Path.Microbiol.Scand.* 76, 297.
20. LAMVIK, J.O. (1969) Antibody synthesis in cultures of blood lymphocytes from booster injected rabbits. *Acta Path.Microbiol.Scand.* 76, 575.
21. LING, N.R. (1968) Lymphocyte stimulation. North-Holland, Amsterdam.
22. LITTLE, J.R. & EISEN, H.N. (1967) Preparation of immunogenic 2,4 dinitrophenyl and 2,4,6-trinitrophenyl proteins. In W.Chase, *Methods of Immunology and Immunochemistry* Academic Press, New York, p.128.
23. MIPHONSON, N.A. (1967) Antigen recognition responsible for the induction in vitro of the secondary response. *Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.* 32, 431.
24. OPPENHEIM, J., WOLSTENCROFT, R.A. & GELL, P.G.H. (1967) Delayed hypersensitivity in the guinea-pig to a protein-hapten conjugate and its relationship to in vitro transformation of lymph node, Thymus and peripheral blood lymphocytes. *Immunol.* 12, 89.
25. OVARY, Z. & BENACERRAF, B. (1963) Immunological specificity of the secondary response with the dinitrophenylated proteins. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 114, 72.

26. HEARMAIN, G., LYCETTE, R.R. & FITZGERALD, P.H.
(1963) Tuberculin-induced mitosis in peripheral blood leucocytes. *Lancet* 1, 637.
27. PAUL, W.E., SISKIND, G.W. & BENACERRAF, B. (1966) Studies on the effect of the carrier molecule on antihapten antibody synthesis. II. Carrier specificity of anti-2,4-dinitrophenylpoly-L-lysine antibodies. *J.Exp.Med.* 123, 689.
28. PAUL, W.E., SISKIND, G.W., BENACERRAF, B. & OVARY, Z. (1967) Secondary antibody responses in haptenic systems: cell population selection by antigen. *J.Immunol.* 99, 760.
29. PAUL, W.E., SISKIND, G.W. & BENACERRAF, B. (1968) Specificity of cellular immune responses. Antigen concentration dependence of stimulation of DNA synthesis in vitro by specifically sensitized cells, as an expression of the binding characteristics of cellular antibody. *J.Exp.Med.* 127, 25.
30. RAJEWSKY, K. (1969) The significance of the carrier effect for the induction of antibodies. *Bayer.Symposium I. Current Problems in Immunology*, O.Westphal, H.E.Bock and E.Grundmann eds., p.91.
31. RAJEWSKY, K., SCHIRRMACHER, V., NASE, S. & JERNE, N.K. (1969) The requirement of more than one antigenic determinant of immunogenicity. *J.Exp.Med.* 126, 1131.
32. SALVIN, S.B. & SMITH, R.F. (1960) The specificity of allergic reactions. *J.Exp.Med.* 111, 465.
33. SCHLOSSMAN, S.F., YARON, A., BEN-EFRAIM & SOBER, H.A. (1965) Immunogenicity of a series of Alpha, N-DNP-L-lysines. *Biochemistry (Washington)* 4, 1638.
34. SCHLOSSMAN, S.F., BEN-EFRAIM, S., YARON, A. & SOBER, H.A. (1965) Immunochemical studies on the antigenic determinants required to elicit delayed and immediate hypersensitivity reactions. *J.Exp.Med.* 123, 1083.

35. SCHLOSSMAN, S.F. (1967) The immune response: Some unifying concepts. *New Engl.J.Med.* 277, 1355.
36. SCHLOSSMAN, S.F. & LEVINE, H. (1967) Immunochemical studies on delayed and Arthus-type hypersensitivity reactions. I. The relationship between antigenic determinant size and antibody combining site size. *J.Immunol.* 98, 211.
37. SCHLOSSMAN, S.F., LEVINE, H. & YARON, A. (1968) Studies on the specificity of antibody to 2,4-dinitrophenyl-poly-L-lysines. *Biochemistry (Washington)* 7, 1.
38. SCHLOSSMAN, S.F., HERMAN, J. & YARON, A. (1969) Antigen recognition: in vitro studies on the specificity of the cellular immune response. *J.Exp.Med.* 130, 1031.
39. SILVERSTEIN, A.M. & GELL, P.G.H. (1962) Delayed hypersensitivity to haptenprotein conjugates. II. Anti-hapten specificity and the heterogeneity of the delayed response. *J.Exp.Med.* 115, 1053.
40. SISKIND, G.W. & BENACERRAF, B. (1969) Cell selection by antigen in the immune response. *Advances Immunol.* 10, 1.
41. STULBARG, M. & SCHLOSSMAN, S.F. (1968) The specificity of antigen-induced thymidine-2-¹⁴ C incorporation into lymph node cells from sensitized animals. *J.Immunol.* 101, 764.
42. WIGZELL, H. (1966) Antibody synthesis at the cellular level. Antibody-induced suppression of 7S antibody synthesis. *J.Exp.Med.* 124, 363.
43. WIGZELL, H. & ANDERSSON, B. (1969) Cell separation on antigen-coated columns. Elimination of high rate antibody forming cells and immunological memory cells. *J.Exp.Med.* 129, 23.

Herrn Professor Dr. F. Scheiffarth möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas danken.

Ein besonderes Anliegen ist es mir, Herrn Priv.Do. Dr. H. Warnatz, der mir immer mit Rat und Tat entscheidend zur Seite stand, meinen Dank auszusprechen.

Für die freundliche Mitarbeit bedanke ich mich herzlich bei Herrn E. Rückert.

Außerdem bedanke ich mich für die stets hilfreiche Unterstützung bei Frau Garke und Fräulein Förster.

L e b e n s l a u f

Am 21.4. 1940 wurde ich als Sohn des praktischen Arztes Anton Gollnick und seiner Frau Erika, geb.Saffran, in Pirna/Elbe geboren.

Von 1946 bis 1954 besuchte ich die Grundschule in Weißenborn Kreis Freiberg/Sachsen, von 1954 bis 1956 die Oberschule in Freiberg. 1956 siedelte ich in die Bundesrepublik Deutschland über, besuchte das Aufbaugymnasium und legte 1962 an der Winfriedschule in Fulda die Reifeprüfung ab.

Nach dem Abitur absolvierte ich eine Gärtnerlehre in Münnersstadt, legte die Gärtnergesellenprüfung ab und studierte anschließend drei Semester Gartenarchitektur in Weihenstephan.

Im Sommersemester 1966 begann ich mit dem Studium der Medizin in Erlangen, das ich nach elf in Erlangen verbrachten Semestern am 16.2. 1972 mit dem Medizinischen Staatsexamen abschloß.

Mein Ziel ist es, Arzt für Allgemeinmedizin zu werden und die Landpraxis meines Vaters weiterzuführen.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990